ПАРАЗИТОЛОГИЯ, IX, 1, 1975

УДК 576.893.192

ПОИСКИ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ХИМИЧЕСКИМ ВЕЩЕСТВАМ У КОКЦИДИЙ

М. В. Крылов, М. Ф. Перов, И. С. Сулин
и А. А. Тальдрик

Всесоюзный научно-исследовательский институт по болезням птиц, Ленинград

На культурах *Eimeria tenella*, полученных от одной ооцисты, изучено формирование резистентности к гликамиду при различных схемах его применения. Установлено, что ритмичное (через 1 и даже 2 генерации) применение кокцидиостатического вещества существенно не тормозит развитие устойчивости к нему. Получена трансформация чувствительных клеток в резистентные при действии на них суммарной ДНК, суммарной РНК и комплексом ДНК-РНК резистентных клеток. Выход трансформантов больше при использовании комплекса ДНК-РНК. Обсуждаются некоторые возможные механизмы формирования резистентности к гликамиду. Резистентные субштаммы обладают повышенной на 13—35% репродукцией ооцист по сравнению с чувствительными к гликамиду кокцидиями. Не установлено корреляции между устойчивостью и процентом споруляции ооцист, между устойчивостью и вирулентностью.

Успешная борьба с возбудителями болезней человека, животных и растений существенно тормозится из-за того, что паразитические организмы сравнительно быстро вырабатывают устойчивые формы, и ранее высокоэффективные химические вещества оказываются совершенно непригодными для профилактики и лечения многих опасных в эпидемиологическом и важных в экономическом отношении заболеваний. Нередко на приобретение лекарственной устойчивости микроорганизмами затрачивается меньше времени, чем требуется исследователям для создания препарата. Наиболее актуальной проблема лекарственной устойчивости стала в последние 20—25 лет, в период широкого и, к сожалению, подчас бесконтрольного применения химиопрофилактических и химиотерапевтических веществ.

Относительно хорошо механизмы лекарственной устойчивости изучены у бактерий (Кудлай, Чубуков и Оганесян, 1972). Еще 5—10 лет тому назад существовала широко распространенная точка зрения, что формирование лекарственной устойчивости у бактерий определяется только мутациями, а распространению устойчивых форм способствует отбор. Но исследователи столкнулись с явлением, которое стало трудно объяснять мутациями. Были обнаружены штаммы бактерий, устойчивые к нескольким различным по химическому строению и механизму действия препаратам.

Открытие у бактерий полового процесса, успехи в изучении генетики этих организмов и исследовании лекарственной устойчивости с использованием методов молекулярной биологии позволили расшифровать сущность механизма множественной устойчивости. Оказалось, что во многих случаях одновременная устойчивость бактерий к препаратам из различных химических групп определяется внехромосомными факторами — эписомами. Эписомы, определяющие устойчивость к химическим веществам, еще называют R-факторами. Эписомы представляют собой кольцевую ДНК, локализуются в цитоплазме бактерий[1] и быстрее хромосом реплицируются, легко передаются филогенетически родственным бактериям реципиентного типа, трансформируя их в устойчивые формы.

Помимо этих двух механизмов возникновения устойчивости высказываются мнения о существовании индуцированного синтеза веществ, разрушающих антибиотические агенты. Сторонники индуцибильности ферментов, катализирующих трансформацию ингибиторов обменных процессов в клетке бактерий, рассматривают этот механизм формирования устойчивости не как появление новых качеств, а как усиление заторможенных или запуск выключенных способностей генотипа. Следовательно, индукция синтеза фермента рассматривается в плане концепции Жакоба и Моно.

На бактериях также был открыт феномен трансформации, когда ДНК, выделенная из резистентных клеток, меняла свойства чувствительных, превращая их в устойчивые. И, наконец, у бактерий был обнаружен перенос детерминант устойчивости от *R*-форм к *S*-формам бактериофагами. Это явление названо трансдукцией. Какое место в передаче генетической информации в природе занимают трансформация и трансдукция, пока остается недостаточно ясным.

Как обстоит дело с расшифровкой механизмов лекарственной резистентности и передачей детерминант устойчивости между особями у простейших? Работ, выполненных в этом направлении, очень мало: Иноки и Мацусиро (Inoki a. Matsushiro, 1960), Иноки и др. (1961). Иноки и др. (1969) сообщили о передаче с ДНК резистентности к пара-розанилину между *Trypanosoma gambiense* и *T. evansi*. Амрейну (Amrein, 1965), Хокингу и Уолкеру (Hawking a. Walker, 1966) не удалось получить четких результатов в опытах по передаче с ДНК лекарственной устойчивости нескольким штаммам трипаносом. Бил и др. (Beale a. oth., 1972), а также Адоут и Бейсон (Adoutte a. Beisson, 1972) показали на *Paramecium aurelia*, что резистентность этих инфузорий к эритромицину и хлорамфениколу управляется неменделевскими генетическими факторами, расположенными в митохондриях, и вызвана мутациями ДНК митохондрий. Попытки вскрыть сущность биологических процессов, формирующих лекарственную устойчивость у кокцидий, пока дали очень немного.

Можно считать установленным факт длительной передачи по наследству устойчивости к гликамиду и акломиду. В течение 20 генераций два штамма *Eimeria tenella* сохраняли к этим препаратам резистентность (Ball, 1968). Болл (Ball, 1966) не получил рекомбинантов при совместном культивировании двух штаммов *E. tenella*, из которых один был устойчив к гликамиду, а другой — к акломиду. Этот же исследователь в 1966 г., а затем Мак Лоуглин (McLoughlin, 1970), пассируя через организм цыплят смеси резистентных (R) и чувствительных (S) штаммов кокцидий в различных сочетаниях, не получили устойчивых штаммов кокцидий. Во всех опытах смеси штаммов R и S после различного периода совместного культивирования теряли R-формы. Следовательно, никаких даже косвенных доказательств существования R-фактора у кокцидий этим исследователям установить не удалось.

Отсутствие сведений о механизмах формирования резистентности к химическим веществам у кокцидий существенно затрудняет разработку рациональных схем применения антикокцидийных веществ. Поэтому в настоящем исследовании мы решили изучить развитие устойчивости у кокцидий к гликамиду при различных схемах его применения, надеясь в этих опытах получить данные, которые хотя бы косвенно могли пролить свет на природу формирования резистентности к антикокцидийному веществу, и затем выяснить возможность передачи детерминант устойчивости к гликамиду с препаратами нуклеиновых кислот.

---

[1] В некоторых случаях возможно включение эписом в структуру хромосомы.

[2] Под генерацией у кокцидий понимается развитие одного поколения от ооцисты до ооцисты, в этот период проходит около 20 митотических делений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Изучение формирования устойчивости у кокцидий к гликамиду (имидазол-4,5-дикарбоксамид) при различных схемах его применения проводили на штамме *E. tenella*, полученном путем заражения одной ооцистой цыпленка, стерильного относительно кокцидий.[3]

Эксперименты были построены таким образом, что кокцидии при их пассировании встречались с гликамидом либо постоянно, либо через 1 или 2 генерации, в одной схеме культивирования кокцидий гликамид чередовали с никарбазином (кокцидиостатический препарат из другого химического класса) через генерацию. Гликамид и никарбазин давали цыплятам с кормом, первый в дозе 6 мг/кг, второй — 25 мг/кг веса цыплят.

Выделение ДНК и РНК производили фенольным методом с применением РНК-азы и ДНК-азы. О нативности нуклеиновых препаратов судили по ультрафиолетовому спектру поглощения, гипохромному эффекту, температуре плавления и молекулярному весу. Ультрафиолетовые спектры поглощения были характерными для нуклеиновых кислот, температура плавления для ДНК — 43°, гипохромный эффект — 6138, молекулярный вес — $5.9 \cdot 10^6$. В препаратах ДНК примесь белка составила 0.5%.

Для выяснения возможности передачи резистентности к гликамиду чувствительным клеткам с препаратами нуклеиновых кислот было создано 3 группы цыплят. Каждой группе цыплят через фистулу в слепые отростки (место развития эндогенных стадий *E. tenella*) вводили ежедневно в течение всего препатентного периода (7 суток) либо ДНК, либо РНК, либо комплекс ДНК-РНК в растворе солин-цитрата.

Инъекции нуклеиновых кислот каждому цыпленку производили в объеме 0.4 мл; в этом объеме содержалось или 50 мкг ДНК, или 360 мкг РНК, или одновременно 25 мкг ДНК и 180 мкг РНК. Таким образом, весь период эндогенного развития, а это около 20 клеточных делений, субштамм S развивался в присутствии нуклеиновых кислот резистентного к гликамиду субштамма кокцидий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Формирование устойчивости у *E. tenella* к гликамиду при различных схемах его применения. Штамм *E. tenella*, полученный из одной ооцисты, был разделен на 5 субштаммов. Один субштамм пассировали через организм цыплят постоянно на фоне гликамида (G), другой встречался с гликамидом через одну генерацию (G_1), третий — через две генерации (G_2), четвертый культивировали на фоне гликамида и никарбазина, чередуя эти препараты через генерацию (GN) и пятый субштамм пассировали на цыплятах, не подвергавшихся обработке препаратом (S).

При наблюдении за изменением чувствительности первых 4 субштаммов к гликамиду в течение 12—13 генераций (пассажей) подмечено несколько интересных закономерностей. Было установлено, что в течение первых трех генераций формы, устойчивые к гликамиду, не улавливаются. Впервые потеря чувствительности к гликамиду отмечена через 4—5 генераций.[4] Затем потеря чувствительности к гликамиду у всех субштаммов независимо от схемы применения препарата идет одинаково. К 12-й генерации различия в летальности среди цыплят, зараженных субштаммами G, G_1, GN и подвергавшихся лечению гликамидом, и группой цыплят, зараженных субштаммом S и нелеченных, становятся недостоверными (табл. 1).

---

[3] Кокцидии — организмы с гаплоидным набором хромосом, только зигота кокцидий диплоидна, редукция хромосом осуществляется при первом зиготическом делении.

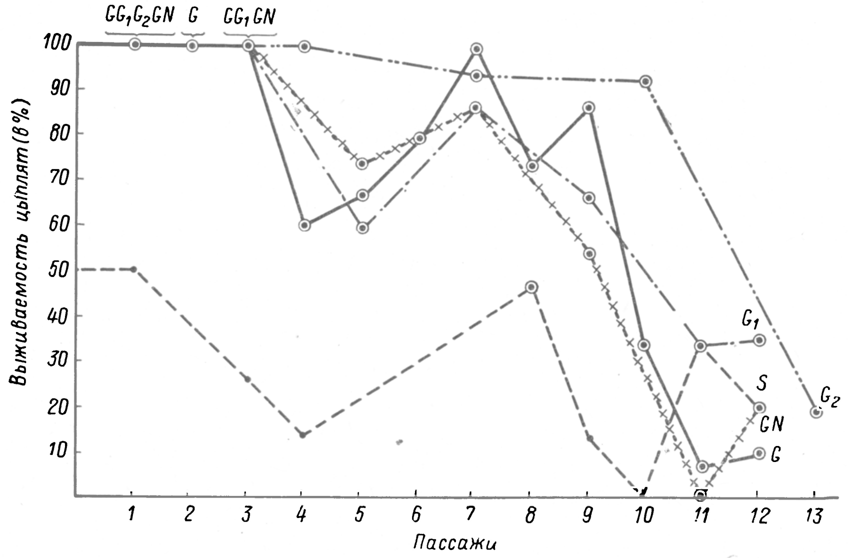
[4] Повышение выживаемости цыплят при заражении их субштаммами кокцидий 7—8-й генераций связано с понижением вирулентности у всех субштаммов кокцидий, обусловленным погрешностями (недостаточная аэрация культуры) при культивировании в этот период экзогенных стадий.

Таблица 1

Резистентность к гликамиду субштаммов *E. tenella* в 12-м пассаже

Субштамм	Доза ооцист, использованная для заражения (в тыс.)	Назначение групп	Число цыплят в группе	Доза гликамида в процентах к корму	Число павших цыплят	Р по отношению к общему контролю № 8
G	50	Подопытная	20	0.003	18	> 0.05
G	50	Контрольная	20	—	17	> 0.05
G_1	50	Подопытная	20	0.003	13	> 0.05
G_1	50	Контрольная	20	—	19	> 0.05
GN	50	Подопытная	20	0.003	16	> 0.05
GN	50	Контрольная	20	—	12	> 0.05
S	50	Общий контроль	20	0.003	3	< 0.01
S	50	» »	20	—	16	

Следовательно, формирование устойчивости к гликамиду у субштаммов G, G_1, GN шло с одинаковой скоростью. Субштаммы кокцидий G_1 и GN к 12-му пассажу встречались с гликамидом 6 раз, а субштамм G — 11 раз, и тем не менее все три субштамма потеряли чувствительность к гликамиду одновременно. Субштамм G_2 к 10-му пассажу имел всего 4 встречи с гликамидом. Проверка чувствительности субштамма G_2 к гликамиду в этот период показала, что он не обладает устойчивостью к препарату. Одиннадцатый пассаж субштамма G_2 был проведен на цыплятах без применения гликамида, однако контроль на чувствительность к гликамиду показал наличие R-форм. Далее был сделан еще один пассаж субштамма G_2 без препарата и проведен опыт по выяснению устойчивости этого субштамма к гликамиду. Эксперимент показал, что субштамм G_2, несмотря на то что он после 10-го пассажа в течение 2 генераций не встречался с препаратом, приобрел устойчивость к гликамиду (см. рисунок). Наблюдения за динамикой формирования резистентности к гликамиду у штаммов G, G_1, G_2 и GN показывают, что в период, когда эти субштаммы



Формирование резистентности у *E. tenella* к гликамиду при различных схемах его применения.

G — субштамм, пассировавшийся постоянно с гликамидом; G_1 — субштамм, пассировавшийся с гликамидом через генерацию; G_2 — субштамм, пассировавшийся с гликамидом через 2 генерации; GN — субштамм, пассировавшийся с гликамидом и никарбазином при чередовании их через генерацию; S — субштамм, пассировавшийся без препарата.

не встречаются с препаратом, в них происходят какие-то события, благодаря которым нарастает количество R-форм, при этом скорость увеличения их числа одинакова или почти одинакова с таковой у субштамма G, постоянно пассировавшегося на фоне гликамида.

Трансформация резистентности к гликамиду. Для выяснения роли нуклеиновых кислот в передаче устойчивости к гликамиду в качестве донора был использован субштамм G^R, в качестве реципиента — субштамм S. Изучалась возможность передачи детерминант резистентности с суммарной РНК, суммарной ДНК и комплексом ДНК-РНК. С целью сепарации R-форм культуры кокцидий с предполагаемыми трансформантами пропассировали однократно на стерильных относительно кокцидий цыплятах с добавлением 0.003% гликамида к корму. Из предыдущих экспериментов известно, что даже трехкратные пассажи кокцидий на фоне гликамида при дозе 0.003% к корму не позволяют выявить у паразитов R-формы (см. рисунок).

О наличии резистентности у подготовленных таким образом кокцидий судили по терапевтическому эффекту при лечении гликамидом цыплят, зараженных изучаемыми субштаммами кокцидий. Оказалось, что там, где кокцидий культивировали с РНК, выделенной из резистентных к гликамиду клеток, в контрольной зараженной кокцидиями и нелеченной группе пало 87% цыплят, а в подопытной, зараженной и леченой, — 64%; там, где передача устойчивости S-клеткам осуществлялась с ДНК резистентных клеток, соответственно погибло 92 и 77% цыплят, а в тех группах, где кокцидии развивались в присутствии комплекса ДНК-РНК, полученного из R-клеток, летальность соответственно составила 89% и 92%. В контрольной группе цыплят, зараженных субштаммом S и подвергавшихся лечению, из 135 погибло только 1.5% (табл. 2).

Таблица 2

Передача резистентности к гликамиду с препаратами нуклеиновых кислот

Назначение групп цыплят	Число цыплят в группе	Препараты нуклеиновых кислот	Характеристика субштаммов	Доза ооцист кокцидий, использованная для заражения (в тыс.)	Доза гликамида в процентах к корму	Число павших цыплят	Процент летальности
Подопытная	97	РНК	Трансформант	20	0.003	64	66.0
»	101	РНК	То же	20	—	87	86.1
»	101	ДНК	» »	20	0.003	77	76.2
»	101	ДНК	» »	20	—	92	91.0
»	101	ДНК—РНК	» »	20	0.003	92	91.0
»	100	ДНК—РНК	» »	20	—	89	89.0
Контрольная зараженная	135	—	S	50	0.003	2	1.5
Контрольная незараженная	135	—	—	—	—	0	0

Таким образом, было установлено, что резистентность к гликамиду можно передать с РНК, ДНК и комплексом ДНК-РНК. Наиболее эффективно трансформация S-клеток в R-клетки осуществляется комплексом ДНК-РНК. Активная роль компонента ДНК-РНК при передаче признака устойчивости к сульфаниламидам у пневмококков была установлена Ивенсом (Evans, 1964). Хонигбергу (Honigberg, 1973) удалось получить передачу признака вирулентности невирулентному штамму *Trichomonas gallinae* со смесью ДНК-РНК.

Трансформирующая роль ДНК была показана в большом количестве опытов на бактериях. Считается, что при этом происходит рекомбинация ДНК резистентного штамма с гомологичной областью хромосомы чувствительной клетки-реципиента.

Значительно труднее интерпретировать феномен трансформации резистентности с РНК. Опираясь на имеющиеся знания, в настоящее время возможно предположить наличие двух механизмов: либо происходит обратная транскрипция, либо иРНК, включаясь в рибосомальный комплекс, долго переживает в нем, и на этой матрице синтезируется белок, определяющий резистентность клеток.

В наших экспериментах логичнее всего предположить наличие обратной транскрипции, потому что перед проверкой на резистентность штамм претерпел один пассаж, а это около 20 клеточных делений, если бы устойчивость к гликамиду определялась только переживаемостью иРНК, резистентность клеток-реципиентов должна была бы значительно понизиться из-за сильного разведения иРНК.

Проведенные эксперименты без сомнения показали, что резистентность к гликамиду у кокцидий регулируется генетически.

Фенотипическое выражение устойчивости к гликамиду. Микробиологами проделана большая работа по выяснению корреляции лекарственной резистентности с изменением других фенотипических признаков у бактерий. Установлено, что потеря чувствительности к лекарственным веществам может сопровождаться замедлением темпа деления бактериальных клеток, формированием мелких колоний, частичной или полной потерей вирулентности, изменением соматических антигенов и иммунологических особенностей. Из этого становится ясным, какое большое практическое и теоретическое значение в проблеме адаптации имеет изучение корреляции химической устойчивости с другими фенотипическими признаками у патогенных простейших. Некоторые наблюдения в этом плане нам удалось провести. Подмечена зависимость между устойчивостью и репродуктивной способностью у кокцидий. Эта работа проведена на 5 генетически родственных субштаммах, из которых 4 в результате различных методов культивирования приобрели устойчивость к гликамиду, а 5-й пассировался на птицах, не подвергавшихся обработке препаратом. Во всех случаях установлено четкое повышение репродукции ооцист у резистентных субштаммов кокцидий по сравнению с чувствительным. Эти различия варьировали от 13 до 35%. Отмечена некоторая тенденция к уменьшению ооцист у резистентных субштаммов. Не установлено зависимости между устойчивостью, скоростью и процентом созревания экзогенных стадий кокцидий, между устойчивостью и вирулентностью (табл. 3).

Таблица 3

Морфобиологические характеристики устойчивых и чувствительного к гликамиду субштаммов *E. tenella*

Суб-штаммы	Репродукция ооцист резистентных субштаммов в процентах к субштамму S	Процент спорулировавших ооцист	Вирулентность		Размеры ооцист (в мк)	$\frac{X_1-X_2}{\sqrt{m_1^2+m_2^2}}$	
			доза ооцист, используемая для заражения (в тыс.)	процент гибели цыплят		длина	ширина
G	126	86.8	20.0	72.0	18—25×15—20	6.0	8.0
G_1	113	85.6	—	—	—	—	—
G_2	135	85.1	—	—	—	—	—
GN	120	83.8	—	—	18—25×15—22	3.5	2.0
S	100	86.9	20.0	70.0	19—26×16—22	—	—

ОБСУЖДЕНИЕ

В опытах по изучению адаптации кокцидий установлено увеличение числа R-клеток в отсутствие гликамида. Несмотря на то что проведенные эксперименты не дают возможности точно ответить на вопрос, почему в период отсутствия ингибитора идет накопление резистентных к нему форм кокцидий, попытка теоретического объяснения этого явления нам кажется целесообразной.

Рассмотрим, исходя из имеющихся знаний о механизмах формирования устойчивости к химическим веществам у протокариота и эукариота, некоторые варианты условий, при которых возможен подобный характер образования резистентности.

1. Возможен ли эписомальный механизм, управляющий накоплением R-форм в период отсутствия препарата?

Допустим, что в процессе копуляции, наступающем после 18—20 митотических делений, в S-клетку вносится детерминанта устойчивости типа эписомы. В этом случае обе копулирующие клетки должны стать резистентными.

Как обстоит дело с поисками эписомальной устойчивости у кокцидий к химическим веществам? Ни Боллу (1966) с гликамидоустойчивыми формами, ни Мак Лоуглину (1970) с формами, резистентными к ампролиуму, обнаружить внехромосомные детерминанты устойчивости при совместном культивировании S- и R-форм не удалось.

Наши наблюдения за резистентностью 12 штаммов кокцидий к химическим веществам из 7 групп (ампролиум, ацилнидразон, 3,5-динитробензамид, гликамид, метилхлорпиндол, сульфадимезин, робенидин) позволили обнаружить штаммы, одновременно устойчивые к сульфадимезину и ацилнидразону, а также штаммы, резистентные к сульфадимезину, ацилнидразону и 3,5-динитробензамиду. Это наводит на мысль о возможном существовании у кокцидий эписомальной устойчивости; однако случаи одновременной устойчивости к нескольким препаратам нужно рассматривать с учетом групповой адаптации. Групповая устойчивость кокцидий к ацилнидразону и 3,5-динитробензамиду возможна в связи с тем, что эти препараты имеют нитрогруппы и, по-видимому, обладают сходным механизмом действия, а следовательно, возможен один механизм устойчивости к ним.

Работами на бактериях было показано, что устойчивость к лекарственным веществам, контролируемая R-фактором, нередко утрачивается спонтанно или исчезает после обработки соединениями, обладающими ДНК-тропностью. В качестве элиминирующих агентов наиболее широко используются акридиновые красители. Мак Лоуглину и Гардинеру (McLoughlin a. Gardiner, 1969) не удалось затормозить развитие резистентности к гликамиду при его совместной даче с хинакрином. Мак Манас, Теймас и Кэмпбелл (McManas, Tamas a. Campbell, 1972) пассировали с акрифлавином штаммы, из которых один был устойчив к амквиноляту, а другой — к ампролиуму. Через 12 генераций штамм, резистентный к амквиноляту, восстановил первичную чувствительность; штамм же, устойчивый к ампролиуму, не изменился. Мак Лоуглин и Чут (McLoughlin a. Chute, 1968) сняли резистентность к ампролиуму у *E. tenella* через 6 пассажей с акрифлавином. Работы этих исследователей дают возможность предполагать наличие нескольких механизмов адаптации кокцидий к кокцидиотропным веществам.

Мы провели изучение влияния акрифлавина на чувствительность субштамма G^R к гликамиду. Субштамм G^R пассировали в течение 4 генераций (около 80 клеточных делений) на фоне акрифлавина. В этот период цыплята, зараженные субштаммом G^R, получали ежедневно 500 мг акрифлавина на 1 кг корма. За время опыта не отмечено существенного повышения чувствительности штамма к гликамиду. Окончательно судить о наличии либо отсутствии внехромосомных детерминант устойчивости к гликамиду на основании отрицательного результата с применением акрифлавина нельзя. Известно, что «элиминируемость» не всегда может быть использована как критерий, определяющий наличие R-фактора. Бодэну и Чабберту (Baudens a. Chabbert, 1967) не удалось устранить устойчивость к ампенициллину у *Salmonella panama*, несмотря на то что этот фактор у нее контролируется эписомой. Таким образом, наши эксперименты не позволили выявить каких-либо косвенных доказательств существования эписомальной резистентности у кокцидий к гликамиду.

2. Допустим, что устойчивость к гликамиду обусловлена мутационным механизмом. В этом случае представляется две возможности — хромосомальные мутации и мутации наследственных структур митохондрий. В случае хромосомальных мутаций накопление мутантных форм в период отсутствия ингибитора возможно, если R-формы имеют преимущество в репродукции перед S-формами. Практически такое преимущество в размножении может быть обусловлено либо подавлением репродукции S-клеток под влиянием предшествующей обработки гликамидом, либо за счет повышения репродукции R-форм. Наблюдение за репродуктивной способностью кокцидий субштаммов S, G и G_1 в четвертом пассаже, когда субштамм G_1 развивался без препарата, но этому предшествовала двукратная обработка его гликамидом, а субштамм G культивировался на фоне гликамида, показало, что количество ооцист у субштамма G_1 одинаково с таковым субштамма S и в 1.5 раза больше, чем у субштамма G. Этот факт говорит о том, что предшествующая обработка гликамидом не подавляет репродуктивную способность чувствительных к нему клеток. Дальнейшее сравнительное изучение репродуктивности R- и S-форм позволило установить у них некоторые различия по этому признаку. Резистентные формы за одну генерацию давали на 13—35% ооцист больше, чем S-формы (табл. 3). Простые расчеты (см. далее о митохондриальных мутациях) показывают, что этого различия в репродукции недостаточно для объяснения рассматриваемого явления. Приведенные соображения делают сомнительным существование механизма формирования устойчивости к гликамиду, обусловленного мутациями хромосом.

Наиболее правдоподобно предположение о наличии механизма формирования резистентности к гликамиду у кокцидий, определяющегося мутациями ДНК митохондрий. Рассмотрим в этом плане динамику формирования резистентности к гликамиду у субштамма G_2 (см. рисунок). Наш метод установления адаптации кокцидий к гликамиду по терапевтическому эффекту имеет определенный предел точности. Он позволяет выявлять R-формы, если их количество в дозе, использованной для заражения цыплят, превышает 20%. Субштамм G_2 к 10-му пассажу встречался с гликамидом 4 раза. Из 15 цыплят, зараженных этим субштаммом и леченных гликамидом, в 10-м пассаже погиб только 1 цыпленок. Таким образом, в этом эксперименте было установлено, что большинство особей субштамма G_2 сохранили чувствительность к препарату, но ни в коей мере нельзя утверждать, что все. Такой же терапевтический эффект можно было бы получить, если бы в использованной для заражения цыплят культуре кокцидий сохранилось около 20% R-форм. Значит, вполне можно предположить, что субштамм G_2 к 10-му пассажу имел около 20% R-форм, но они не были выявлены нашим методом.

Из предыдущих экспериментов по изучению репродуктивности у кокцидий известно, что R-формы дают на 13—35% (в среднем около 25%) ооцист больше, чем S-клетки. Следовательно, через генерацию в выборке 50 тыс. ооцист (доза, используемая для заражения одного цыпленка) количество R-форм увеличится на 25%, что составит 12.5 тыс. ооцист. Такого количества R-форм недостаточно, чтобы вызвать гибель цыплят, которую мы наблюдали в 11-м пассаже (см. рисунок). Если же резистентность к гликамиду обусловлена мутациями ДНК митохондрий, то при копуляции все потомки гибридных клеток R и S должны стать устойчивыми к гликамиду. Теоретические расчеты показывают, что их в выборке 50 тыс. должно быть около половины. Этого количества R-форм вполне достаточно, чтобы обусловить гибель 26.4% цыплят в 11-м пассаже.

Дальнейшие расчеты в этом направлении показывают, что в следующий 12-й пассаж более $^4/_5$ клеток должны стать резистентными к гликамиду, и терапевтическая активность препарата должна значительно снизиться. Эти теоретические соображения полностью подтверждаются экспериментально. Действительно, при проверке чувствительности к гликамиду субштамма G_2 в 13-м пассаже гибель цыплят, зараженных кокцидиями субштамма G_2 и леченных гликамидом, составила 82%.

Таким образом, увеличение R-форм у кокцидий в период отсутствия гликамида может быть объяснено мутациями митохондриальной ДНК.

Благодарим Л. А. Коровицкую за наработку гликамида, а также профессора Л. Н. Серавина и А. Л. Юдина за полезные советы и стимулирующие дискуссии.

ВЫВОДЫ

1. Ритмичное применение гликамида (через 1 и 2 генерации) существенно не тормозит развитие устойчивости к нему у кокцидий. Это обусловлено увеличением количества резистентных форм паразитов после встречи с препаратом в период отсутствия ингибитора.
2. Устойчивость к гликамиду может быть передана чувствительным формам кокцидий с суммарной ДНК, суммарной РНК и комплексом ДНК—РНК резистентных клеток.
3. Культивирование устойчивых к гликамиду форм кокцидий на фоне акрифлавина в течение 4 генераций не снимает у них резистентности к гликамиду.
4. Резистентные к гликамиду формы кокцидий обладают повышенной на 13—35% репродукцией ооцист, не установлено корреляции между устойчивостью и процентом споруляции ооцист, между устойчивостью и вирулентностью.

Литература

Кудлай Д. Г., Чубуков В. Ф. и Оганесян М. Г. 1972. Генетика лекарственной устойчивости бактерий. Изд. «Медицина». М. : 1—255.

Adoutte A. a. Beisson J. 1972. Evolution of mixed populations of genetically different mitochondria in Paramecium aurelia. Nature, 235 (5338) : 393—396.

Amrein Y. U. 1965. Genetic transfer in trypanosomes. II. Genetic transformation in Trypanosoma equiperdum. Exp. Parasitol., 17 : 264—267.

Ball S. J. 1966. The development of resistance to glycarbylamide and 2-chloro-4-nitrobenzamide in Eimeria tenella in chickens. Parasitol., 56 (1) : 25—37.

Ball S. J. 1968. The stability of resistance to glicarbylamide in Eimeria tenella. Res. Vet. Sci., 9 : 149—151.

Baudens I. G. et Chabbert J. A. 1967. Analyse des facteure de résistance transférables isolés en France. Ann. Inst. Pasteur., 112 : 565.

Beale G. H., Knowles J. K. C. a. Tait A. 1972. Mitochondrial genetics in Paramecium. Nature, 235 (5338) : 396—397.

Evans A. 1964. Introduction of specific drug resistance properties by purified RNA — containing fractions from pneumococcus. Proc. nat. Acad. Sci., 52 : 1442.

Hawking F. a. Walker P. J. 1966. Analysis of the development of arsenical resistance in trypanosomes in vitro. Exp. Parasitol., 18 : 63—86.

Honigberg B. M. 1973. Mechanisms of pathogenicity among parasitic protozoa. Progress in Protozoology abstracts of papers read of the Fourth International Congress on Protozoology : 8—39.

Inoki S. a. Matsushiro A. 1960. Transformation of drug-resistance in trypanosoma. Biken's J., 3 : 101—106.

Inoki S., Ono T. a. Murata J. 1969. Properties of transforming DNA in p-rosaniline resistance transformation of Trypanosoma gambiense. Progress in Protozoology. 3-th International Congress on Protozoology : 26—27.

Inoki S., Taniachi J., Sakamata H., Ono T. a. Kubo R. 1961. Interspecific transformation of drug resistance between Trypanosoma gambiense and Trypanosoma evansi. Biken's J., : 111—119.

McManas E. C., Tamas T. a. Campbell W. C. 1972. Treatment of drug-resistant Coccidia with acriflavine. Res. Vet. Sci., 13 : 494—495.

McLoughlin D. K. 1970. Coccidiosis. Experimental analysis of drug resistance. Exp. Parasitol., 28 : 129—136.

McLoughlin D. K. a. Chute M. B. 1968. Drug resistance in Eimeria tenella. VII. Acriflavine mediced loss of resistance to amprolium. J. Parasitol., 54 (4) : 696—698.

McLoughlin D. K. a. Gardiner J. L. 1969. Drug resistance in Eimeria tenella. VIII. The influence of quinacrine hydrochloridae on development of resistance to glycarbylamide. J. Parasitol., 55 (1) : 208—210.

MECHANISMS OF RESISTANCE TO CHEMICAL SUBSTANCES IN COCCIDIA

M. V. Krylov, M. F. Perov, I. S. Sulin and A. A. Taldrik

SUMMARY

The formation of resistance to glycamide at different schemes of its application was studied on the cultures of *E. tenella* obtained from one oocyst. It was established that the rhythmical (in one and even two generations) application of a coccidiostatic substance does not hinder essentially the development of resistance to it. There was observed the transformation of sensory cells into resistant ones under the effect of summary DNA, summary RNA and the complex DNA—RNA. The production of transformants is higher when the complex DNA—RNA is used. Some possible mechanisms affecting the formation of resistance to glycamide are discussed. Resistant substrains show an increased (by 13 to 35%) reproduction of oocysts as compared to Coccidia sensitive to glycamide. No correlation was established between the resistance and per cent of sporulation of oocysts, between resistance and virulence.